

## LC/MS-MSを用いたプロスタノイドの一斉定量分析法の開発と病態解析への応用に関する基礎的研究

著者	高畑 昌代
号	303
発行年	2001
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15409">http://hdl.handle.net/10097/15409</a>

氏 名 (本籍)                    <sup>たか</sup>高                    <sup>ばたけ</sup>畑                    <sup>まさ</sup>昌                    <sup>よ</sup>代

学 位 の 種 類                    博                    士 (薬                    学)

学 位 記 番 号                    薬 博 第                    3 0 3                    号

学位授与年月日                    平 成 14 年 3 月 25 日

学位授与の要件                    学位規則第 4 条第 1 項該当

研 究 科、専 攻                    東北大学大学院薬学研究科  
(博士課程) 分子生命薬学専攻

学 位 論 文 題 目                    LC/MS-MS を用いたプロスタノイドの一斉定量分析  
法の開発と病態解析への応用に関する基礎的研究

論文審査委員                    (主 査)  
教授 水 柿 道 直                    教授 大 内 和 雄

教授 後 藤 順 一

# 論文内容要旨

## 【目的】

プロスタノイドはアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase, COX) によって生体内で生成される一連の化合物の総称である。ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> により細胞膜のリン脂質から遊離されたアラキドン酸は, COX によりプロスタグランジン (prostaglandin, PG) やトロンボキサン (thromboxane, TX) に変換される。これらのプロスタノイドは類似の構造を有し, 生体の機能調節に重要な役割を果たしている。その産生量の変動は種々の疾患の発症や進行に関与するため, 医薬品としても応用されている。すなわち, 疾患におけるプロスタノイドの産生量の変動と病態との関連性の検討は, 対象疾患の発症の予防や治療に応用可能である有用な知見をもたらすものと考えられる。

慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は自己免疫疾患の一つで, 多発性の関節滑膜炎を特徴とする全身性炎症性疾患であり, 滑膜において自己の変性免疫グロブリン G (immunoglobulin G, IgG) に対し自己抗体が反応することにより発症する。難治性で慢性に推移し, 長期にわたる治療を必要とする。その病理学的な特徴としては, 関節腔に存在する滑膜細胞上の変性 IgG により免疫系の活性化が生じ, 炎症性サイトカインが誘導され, プロスタノイド等のメディエーターが産生される。その結果, 滑膜組織の肥厚が起り, フィブリノイド変性, リンパ球や形質細胞の浸潤及び形質細胞によるリウマトイド因子の産生, マクロファージの増殖などを見る。炎症が進むと滑膜細胞から産生されるコラゲナーゼの働きによって軟骨及び骨組織が浸食されていくため, 慢性的な疼痛を伴う関節変形が生じる。このように, RA の病態変化には滑膜細胞の増殖が大きく関与していると考えられている。

RA 患者から採取した関節液に含まれる PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> 等の様々なプロスタノイドは, 滑膜や軟骨組織等から産生されることが報告されている。また, ヒト滑膜細胞や軟骨組織中の微小血管内皮細胞は, インターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1) の刺激により PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGF<sub>2</sub> 及び PGI<sub>2</sub> を産生することが報告されている。炎症刺激により COX-2 が発現することが明らかとなって以来, PGE<sub>2</sub> の産生量は COX-2 活性の指標として用いられているが, RA の病態におけるプロスタノイドの役割とその産生量に関する報告は未解明な部分が多く, これらプロスタノイド産生の変化の, 病変部位における検討は重要なものと考えられる。

このような背景から, 本研究では滑膜細胞における 4 種のプロスタノイド PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub>, 及び TXA<sub>2</sub> の産生量と RA との関連性を明らかにするため, 簡便で高感度かつ化合物選択性に優れる液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS-MS) を用いた PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> と PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> それぞれの安定変換体である 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, TXB<sub>2</sub> の一斉同時定量法を確立した。さらに, RA 患者由来滑膜細胞における PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 及び TXB<sub>2</sub> の産生量の変動について検討した。

## 【方法】

四重極型タンデム質量分析計にはエレクトロスプレーイオン化インターフェースを装着した Quattro II

(micromass), セミマイクロ H<sub>2</sub>PLC システムはナノスペース SI-1 (資生堂), 分離カラムとして C<sub>18</sub>Capcell Pak UG120 (資生堂; φ 1.5 x 150 mm, 5 μm) を使用した。PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 及び TXB<sub>2</sub> を測定対象とし, 4 種のプロスタノイドの同時定量法の開発並びに培養上清し中の PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 及び TXB<sub>2</sub> の定量を行った。

## 【結果及び考察】

### 1. PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 及び TXB<sub>2</sub> の一斉同時定量法の開発

LC/MS-MS を用いて, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 及び TXB<sub>2</sub> の測定法を確立した。アセトニトリル/水/酢酸系 (pH 5.0) の移動相を用い, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 及び TXB<sub>2</sub> 標準品のマススペクトルを測定したところ, それぞれの擬分子イオン [M-H]<sup>-</sup> が相対強度強く観測された。また, それぞれの重水素標識体のマススペクトルではそれぞれ 4 マスユニット増加した擬分子イオン [M-H]<sup>-</sup> が観測された。つぎに, それぞれの擬分子イオン [M-H]<sup>-</sup> をプリカーサイオンとし, フローインジェクションモードでそれぞれの標準品及び各重水素標識体のプロダクトイオンマススペクトルを測定したところ, それぞれのプリカーサイオンをはじめとし, 各化合物に特徴的なイオンが観測された。この結果より, PGE<sub>2</sub> m/z 351 > m/z 271, PGF<sub>2α</sub> m/z 353 > m/z 192, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> m/z 369 > m/z 163, TXB<sub>2</sub> m/z 369 > m/z 195 をモニタリングする SRM により測定を行うこととした。各化合物の標準品を用いて SRM を行ったところ, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 及び TXB<sub>2</sub> はそれぞれ約 5.6 分, 約 5.1 分, 約 3.7 分, 約 4.5 分にピークを与えた。各重水素標識体を内部標準物質 (internal standard, IS) として用い, 各化合物と IS とのピーク面積比により検量線を作成したところ, いずれのプロスタノイドとも 10 pg から 10 ng の範囲で良好な直線性を示した (r = 0.997 ~ 0.999)。次いで試料からの精製に固相カラムによる単回抽出法を設定後, 4 種同時測定の可能性について検討を加え, 高感度かつ短時間に測定が可能な方法を構築した。バリデーションを行ったところ, 本測定法の真度は 94.1 % から 106.6 % と良好な結果を示した。また, 各濃度の測定値における変動係数は 7.8 % 以下であり, 本測定法が高い信頼性を有することを示した。これまで, これら 4 種のプロスタノイドの一斉定量法の報告はなされておらず, 本法が新規である。

LC/MS-MS による測定が可能になり, 今後, カラムスイッチングを使用した前処理も含めた測定の自動化を行うことによって, その臨床応用への道が開けるものと考えている。また, いくつかの疾患において特定のプロスタノイドが特異的に増加することが知られており, 同時測定ができることでその病態についてより正確に把握することが可能となる。

質量分析によるプロスタノイドの測定が汎用化されれば, プロスタノイドの生理的意義や病態への関与が明らかになり, 診断や治療への応用に飛躍的に発展するものと考えられる。

### 2. 滑膜細胞の PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 及び TXB<sub>2</sub> 産生能についての基礎的検討

病態モデルとして RA 患者より採取, 培養した滑膜細胞を用い, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, 6-keto-PGF<sub>1α</sub> 及び TXB<sub>2</sub> の産生量の変動について検討した。RA 患者由来滑膜細胞の各プロスタノイド産生量は無刺激時には極微量で, 病態モデルとしてプロスタノイド産生の解析に用いるには細胞の活性化が必要であると考えられた。そこでリポポリサッカライド (lipopolysaccharide, LPS) または IL-1β を添加した際のプロスタノイド産生

量を経時的に検討した。

**2-1 LPS の添加効果** LPS 非添加時においてはいずれのプロスタノイドも 20 pg ( $6 \times 10^5$  cell) 以下であったのに対し、LPS の添加により産生量は経時的に増加した。PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、6-keto-PGF<sub>1α</sub> 及び TXB<sub>2</sub> の産生量はそれぞれ 96.3, 33.2, 93.1, 79.8 pg ( $6 \times 10^5$  cell) と 24 時間後の値はいずれのプロスタノイドにおいても LPS 非添加時に比べ有意な高値を示した。

**2-2 IL-1β の添加効果** IL-1β 添加により、いずれのプロスタノイドとも産生量は経時的に増加した。特に IL-1β 添加後 24 時間における PGE<sub>2</sub> 及び 6-keto-PGF<sub>1α</sub> の産生量は 9743 pg, 2733 pg ( $1 \times 10^5$  cell) と顕著に増加した。これに対し、IL-1β 添加後 24 時間における TXB<sub>2</sub> の産生量は 16.7 pg ( $1 \times 10^5$  cell) であり、その変化は小さかった。次にプロスタノイド産生に及ぼす IL-1β の影響の濃度依存性について検討したところ、いずれのプロスタノイドとも IL-1β 濃度依存的に産生量は増加した。また、この産生は COX 阻害剤である、ジクロフェナクによって大きく阻害されることを示した。これは炎症性サイトカインである IL-1β の刺激により COX-2 誘導され、その結果として PGE<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub> が産生されることによるものと考えられる。

また、TX の産生量の増加は PGE<sub>2</sub>、6-keto-PGF<sub>1α</sub> に比して非常に小さいものであった。このことは、生体試料における TX 量の増加は滑膜細胞によるものではなく、他の何らかの要因によるものと考えられた。

#### 【結論】

慢性関節リウマチにおけるプロスタノイドの産生量の変動は病態と密接に関連する可能性が示された。高感度で簡便な測定が可能である LC/MS-MS によるプロスタノイドの同時測定が医療の現場において病態の把握や治療効果の判定等に際し、有益な情報を与えるものと期待される。

## 審査結果の要旨

アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase, COX) によって生体内で生成されるプロスタノイドは、産生量が微量であり、その定量的な解析は困難とされている。また、慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は自己免疫疾患の一つで、多発性の関節滑膜炎を特徴とする全身性炎症疾患であり、その発症や病態の進行には滑膜組織の肥厚やインターロイキン-1 (interleukin-1, IL-1) 等のサイトカインやプロスタノイド等が関与するものと考えられているが、その実体は未だ明らかにされていない。

本研究では、まず RA の病態との関連性が考えられる 4 種のプロスタノイド  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGI}_2$  及び  $\text{TXA}_2$  の LC 上の挙動解析、各標準品及び内部標準物質のマススペクトル、それぞれの擬分子イオン  $[\text{M}-\text{H}]^-$  をプリカーサーイオンとしたプロダクトイオンマススペクトルの検討による選択イオンレコーディング (SIR) の条件設定を行い、さらに検量線の作製と添加回収試験、試料として細胞培養液からの固相カラムを用いた簡便なクリーンアップの検討を行い、これら 4 種のプロスタノイドの簡便で高感度かつ化合物選択性に優れる液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析 (liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS-MS) を用いた一斉同時定量法を新規に確立した。

さらに、病態モデルとして RA 患者より調製された滑膜細胞を用い、これら 4 種プロスタノイドの産生量の変動について検討した。その結果、RA 患者由来滑膜細胞の各プロスタノイド産生量は超微量で検出が困難であるが、LPS 及び IL-1  $\beta$  の添加により産生量は経時的、用量依存的に増加すること及び特に IL-1  $\beta$  添加後 24 時間における  $\text{PGE}_2$  及び 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  の産生量は顕著に増加することを明らかにした。さらに、これらの産生は COX 阻害剤である、ジクロフェナクによって阻害されることを示した。これらは、RA 患者の主訴である慢性頭痛の要因と考えられる  $\text{PGE}_2$  とプロスタサイクリンが、IL-1  $\beta$  の刺激により滑膜細胞から産生されること及びその産生抑制へのジクロフェナクの有用性を示した重要な知見である。

本研究で開発された、高感度で簡単な LC/MS-MS によるプロスタノイドの同時定量法を用いることにより、RA におけるプロスタノイドの産生量の変動は病態と密接に関連する可能性を示した。開発された方法と成果は今後の RA 病態解析のみならず、様々な疾患におけるプロスタノイドの生理的意義の検討に有用な知見であり、薬学において有益な成果であると判断する。

よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。